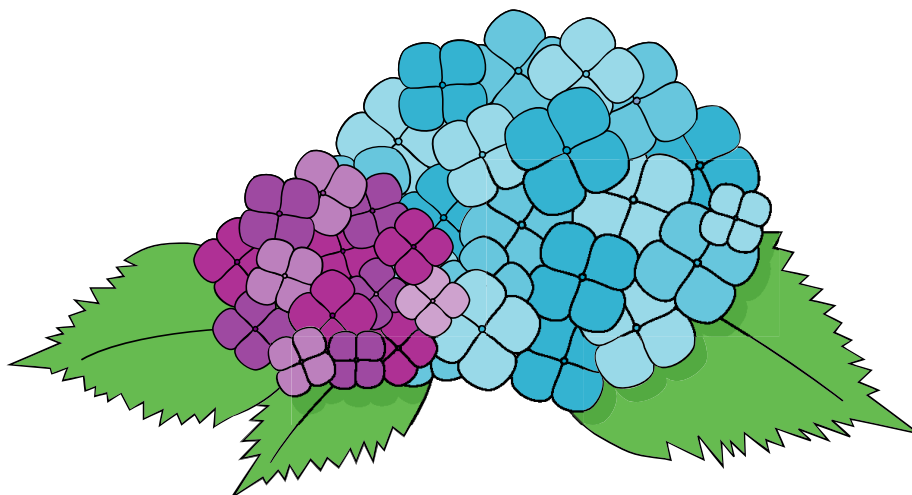
アジサイ葉化病診断キット

Hydrangea phyllody Phytoplasma Detection Kit

取扱説明書

version 2.0.0

製品コード
NE0101

アジサイ葉化病診断キット
取扱説明書 version 2. 0. 0

【はじめにお読みください】

　このたびは、**アジサイ葉化病診断キット**をお買い上げ頂き、誠にありがとうございます。この取扱説明書をよくお読みの上、正しい方法でキットを使用してください。

使用上の注意

1. 本キットは、LAMP 法を用いてアジサイ（Hydrangea）よりファイトプラズマ（*Candidatus* Phytoplasma asteris および *Candidatus* Phytoplasma japonicum）を検出するための試薬です。医療行為および臨床診断等の目的では使用できません。

2. 本キットは、日本国内で採取された葉化病罹病アジサイ樹木を用いて性能を確認しております。

3. 本キットの保存方法は、【キット内容と保存温度】（2 ページ）に記載していますのでご確認ください。各試薬は納品後正しい温度で遮光して保存し、6 ヶ月以内に使用してください。また、過度の冷却および試薬の凍結、融解の繰り返しは避けてください。

4. 本キットを使用する際は、この**取扱説明書**の記載内容に従ってください。記載内容と異なる使用方法および使用目的により発生するトラブルに関しましては、株式会社ニッポンジーンでは一切の責任を負いかねますので、あらかじめご了承ください。

5. 本キットによる判定結果を二次利用する場合は、必ず使用者の責任の下で行ってください。キット性能の異常によって発生するトラブルの場合を除き、株式会社ニッポンジーンでは一切の責任を負いかねますので、あらかじめご了承ください。

6. 検査環境の汚染を防ぐため、検査後サンプルおよび**Phytoplasma陽性コントロール**の電気泳動法等による操作やオートクレーブ高圧滅菌処理は行わないでください。

7. 本キットに含まれていない化合物を併用する場合は、使用する化合物の危険性に関して十分な知識が必要です。また、本キットに含まれている試薬に他の化合物を混合しないでください。本キットの安全な取り扱いについては株式会社ニッポンジーンホームページにて製品安全データシート（MSDS）を公開していますので、ご参照ください。
   株式会社ニッポンジーン； http://nippongene-analysis.com/

8. 本キットは食べ物ではありません。飲み込んだり、目に入れたりしないようご注意ください。検査中は皮膚等に試薬が触れないよう、白衣、手袋等で身体を保護してください。

9. ＬＡＭＰ法は栄研化学株式会社が特許を保有しています。株式会社ニッポンジーンは、ＬＡＭＰ法を用いたファイトプラズマ検出用試薬の開発、製造、および販売を許諾されています。

10. **アジサイ葉化病診断キット**は、株式会社富士通システムズ・イーストが運営する、e Genome Order（**イーゲノムオーダー**）より販売しています。ご購入に関しては、株式会社富士通システムズ・イーストまでお問い合わせください。
    株式会社富士通システムズ・イースト
    e Genome Order（**イーゲノムオーダー**）； http://genome.e-mp.jp/

目次

ページ

本キットに含まれているLAMPプライマーセットおよびこのLAMPプライマーセットを用いたLAMP法によるアジサイ葉化病ファイトプラズマの検出技術は、東京大学 植物病院®により開発されました。

1. キット説明

【アジサイ葉化病診断キットの概要】

本キットはLAMP法を利用してアジサイ葉化病ファイトプラズマ（*Candidatus* Phytoplasma asteris および *Candidatus* Phytoplasma japonicum）を検出するキットです。LAMP法はインフルエンザウイルス感染の診断およびノロウイルス、レジオネラ属菌、サルモネラ属菌、腸管出血性大腸菌等の検査にも用いられている迅速、簡便なDNA増幅技術であり、その優れた特異性と高い感度を最大の特長とします。本キットでは、LAMP法によりアジサイ葉化病ファイトプラズマゲノムDNAの一部を増幅し、増幅の有無からアジサイ葉化病ファイトプラズマの存在を判定します。

検出に必要な操作は、キットに添付されている**Phytoplasma抽出液**を用いてアジサイの葉やがく（葉脈部分）より抽出したDNAを検査溶液（**P. asteris検査液**あるいは**P. japonicum検査液**と、**Phytoplasma酵素液**、**蛍光発色液**の混合液）に加えて61°Cに60分間保温するのみであり、きわめて簡便です。アジサイ葉中にファイトプラズマが存在する場合、本キットに含まれているLAMPプライマーセットによってファイトプラズマゲノムDNAに特徴的な配列が増幅されます。一方で、アジサイ葉中にファイトプラズマが存在しない場合には、DNAの増幅は起こりません。

判定にはDNA増幅の有無を**蛍光発色液**の発色の有無によって確認する目視判定法を採用しており、DNA増幅反応から検出までを同一反応チューブ内の完全閉鎖系で行うため、安全に短時間でアジサイ葉化病ファイトプラズマゲノムDNAを検出することが可能です。

【アジサイ葉化病ファイトプラズマとその診断】

アジサイの花が葉化し数年で枯死に至る「葉化病」は、海外においては1930年頃、日本では1985年に発生が報告されており、その病原は植物病原細菌の一種であるファイトプラズマであることが確認されています。

ファイトプラズマは、植物の篩部に寄生する植物病原細菌であり、1967年に世界に先駆けて我が国で発見されました。世界中で700種類以上の植物に病気を引き起こし、昆虫により伝搬される、農業上きわめて重要な植物病原体です。アジサイの葉化病は世界各地で発生が報告されており、我が国でも全国的に発生している恐れがあります。本病の病原体として、2 種類のファイトプラズマ（*Ca.* P. japonicum および *Ca.* P. asteris）が知られています。*Ca.* P. japonicum によるアジサイ葉化病は、我が国でのみ発生が報告されているファイトプラズマ病です。また、*Ca.* P. asteris によるアジサイ葉化病はこれまで海外でのみ発生例がありましたが、近年、我が国においても発生が確認されています。

アジサイ葉化病の被害拡大を防ぐためには、感染植物の除去等の防除手段を講じる必要があります。そのためには罹病樹の早期発見が不可欠となります。本キットを用いることにより、上記の 2 種類のファイトプラズマをそれぞれ検出することができます。

【LAMP（Loop-mediated Isothermal Amplification）法】

LAMP法は、一定温度でDNA増幅反応が進行する画期的な技術です。従来の方法と比較して特異性に優れ、またその高いDNA増幅反応効率から、短時間反応および簡易検出が可能である等の利点を有しています。LAMP法の詳細な原理については、栄研化学株式会社ホームページをご参照ください。

栄研化学株式会社
Eiken GENOME SITE； http://loopamp.eiken.co.jp/

【本キットに含まれる合成オリゴヌクレオチドに関して】

本キットに含まれるプライマーは、全て「リライアブル＆トレーサブルオリゴ」を使用しています。「リライアブル＆トレーサブルオリゴ」は、株式会社ニッポンジーン マテリアルが製造する高信頼性オリゴヌクレオチド「リライアブルオリゴ」の一つです。ISO 13485:2003 に準拠した品質マネジメントシステム、専用陽圧ルームでの製造、チェックリストによる工程管理、トレーサビリティー完備を特長としています。詳細に関しましては、株式会社ニッポンジーン マテリアルホームページをご参照ください。

株式会社ニッポンジーン マテリアル； http://www.nippongenematerial.com/

2. キット内容

【キット内容と保存温度】

アジサイ葉化病診断キット

24テスト用（製品コード: NE0101）

試薬名（チューブラベル）	頭部ラベル色	内容量	保存温度
		24テスト用	
取扱説明書	–	1 部	室温
検査用チューブ	–	48本	室温
P. asteris検査液	赤色	525 µl	–20°C (遮光)
P. japonicum検査液	緑色	525 µl	–20°C (遮光)
Phytoplasma酵素液	黄色	50 µl	–20°C (遮光)
蛍光発色液	紫色	50 µl	–20°C (遮光)
Phytoplasma陽性コントロール	灰色	50 µl	–20°C (遮光)
ミネラルオイル	青色	1,000 µl	–20°C (遮光)
Phytoplasma抽出液	–	5,000 µl	–20°C (遮光)

取り扱い上の注意

◆ 本キットは、2 種類のアジサイ葉化病ファイトプラズマ（*Ca*. P. japonicum および *Ca*. P. asteris）を検出するための検査液をそれぞれ 24 テスト分ずつ含んでいます。原則として、1 サンプルに対し両方の検査液（**P. asteris検査液**および**P. japonicum検査液**）により検査を実施してください。

◆ 本キットでは、各検査液に対し25テスト分の検査溶液をまとめて作製することで、24テスト分の検査反応を行うことが可能です。24テスト分以下の検査反応を複数回に分けて行う場合、試薬が不足しますのでご注意ください。

◆ **検査用チューブ**に水滴が付着している場合は、開封前に完全に乾燥させてから使用してください。

◆ **取扱説明書**および**検査用チューブ**以外の試薬は–20°Cで遮光して保存し、納品後 6 ヶ月以内に使用してください。

◆ 試薬は使用ごとに融解し、残った試薬は再度–20°Cで保存してください。凍結、融解の繰り返しにより製品の性能が低下する恐れがありますので、必要な場合は試薬を数回分ごとに小分けして保存してください。

◆ **Phytoplasma酵素液**を室温あるいは冷蔵庫等に長時間放置したり、過度の冷却で凍結させたりしないようご注意ください。酵素の働きが低下する可能性があります。

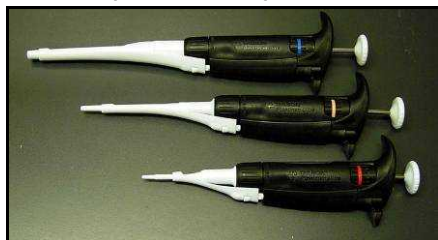
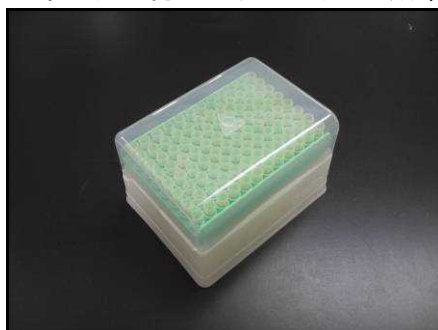
◆ **Phytoplasma陽性コントロール**は、アジサイ葉化病ファイトプラズマのゲノムDNAに特徴的な配列を含むDNA溶液です。検査環境への汚染を防ぐため、使用の際には溶液を飛散させたり、溶液に触れたフィルター付マイクロチップが他の器具や試薬に接触したりしないようご注意ください。

◆ 連続分注を行うと試薬への汚染が発生する可能性がありますので、フィルター付マイクロチップは 1 回分注するごとに使い捨てとして使用してください。

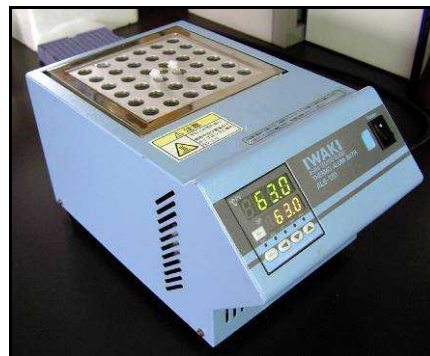
◆ **ミネラルオイル**に関しては、労働安全衛生法第五十七条の二第一項「名称等を通知すべき有害物（第五百五十一号)」に該当します。必ずMSDSを参照の上、使用してください。

3. 必要な器具、機器

【必ずご準備頂く器具、機器】

- マイクロピペット
  (0.5-10 µl、10-100 µl、200-1,000 µl)

- フィルター付マイクロチップ（滅菌済)*

- マイクロチューブ
  (1.5 ml あるいは 2.0 ml)

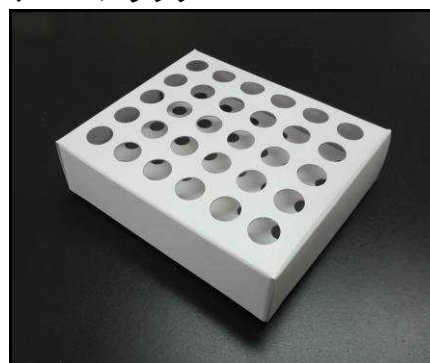
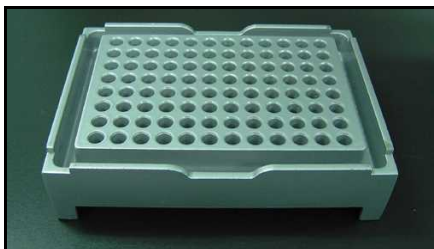
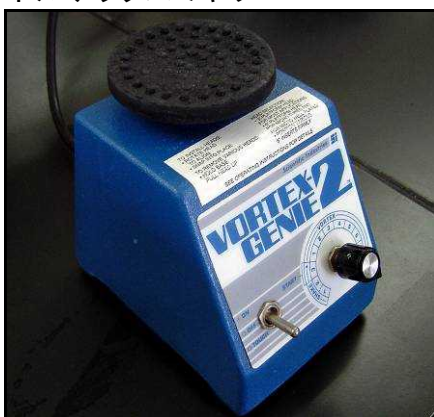
- 使い捨て手袋

- インキュベーター（恒温器）
  ウォーターバス、ヒートブロック、サーマルサイクラー、エアーインキュベーター等、61°C、80°C、95°C それぞれを保持する機器が必要です。

- 剃刀

- 氷（クラッシュアイス）

【その他の器具、機器】

下記の器具、機器は本キットの使用に必須ではありませんが、必要に応じてご準備ください。

- チューブラック*

● アルミラックあるいはプレートラック

● ボルテックスミキサー

● 簡易遠心機（1.5 ml チューブ用）

● 簡易遠心機（0.2 ml チューブ用）

● フロートプレート*
ウォーターバスで保温する際に使用します。

● UV 照射装置
蛍光発色液による検出の際に使用します。
240−260 nm あるいは 350−370 nm の範囲の波長を出力する装置が必要です。

● 防護用ゴーグルあるいはフェイスシールド

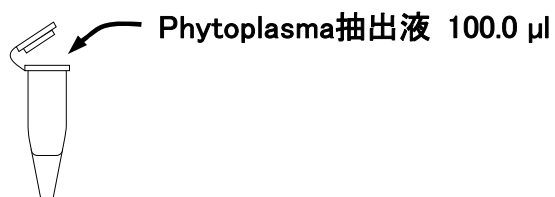
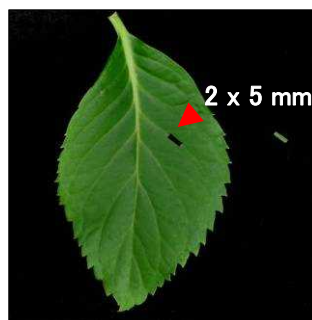
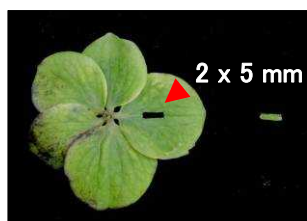
フィルター付マイクロチップ、チューブラック、フロートプレートがセットになった**診断キットスターターセット**（製品コード： NE0051）も販売しております。ご購入に関しては、株式会社富士通システムズ・イーストまでお問い合わせください。

4. キット使用方法

【簡易プロトコル】

本キットの詳細な使用方法は 7 ページ以降を参照してください。

簡易プロトコル

1. Phytoplasma抽出液を 1 サンプルあたり 100.0 µl ずつ分注する

2. アジサイのがくあるいは葉の葉脈部分を切り取りPhytoplasma抽出液に浸す

3. 95°Cで 10 分間保温する（DNAサンプルとする）

4. 検査溶液を必要量まとめて作製する

試薬	1 テストあたり	8+1 テスト*	24+1 テスト*
P. asteris検査液 あるいは P. japonicum検査液	21.0 µl	189.0 µl	525.0 µl
蛍光発色液	1.0 µl	9.0 µl	25.0 µl
Phytoplasma酵素液	1.0 µl	9.0 µl	25.0 µl
検査溶液合計	23.0 µl	207.0 µl	575.0 µl

＊ 分注時の液量の不足を防ぐため、1 テスト分多めに作製する。

簡易プロトコル

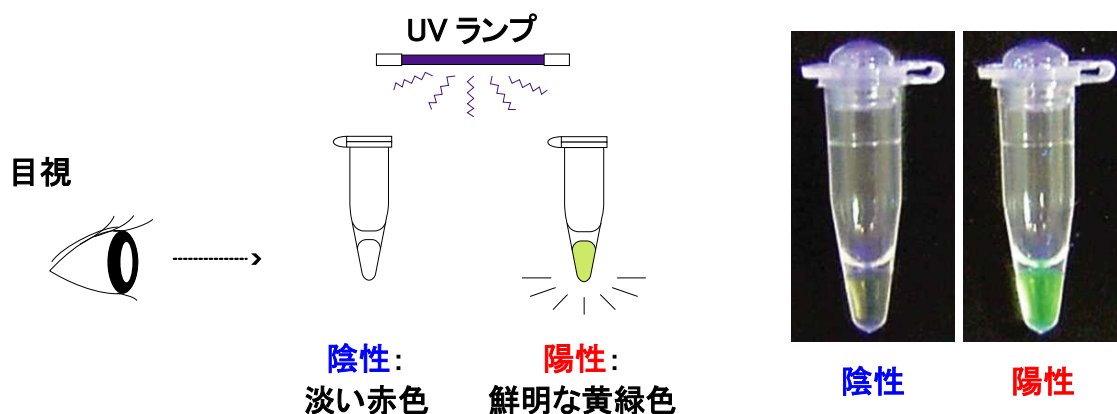
5.　検査溶液を 1 テストあたり 23.0 µl ずつ分注する

6.　サンプル 2.0 µl を添加する

7.　ミネラルオイルを入れる

6.　61˚C、60 分間

7.　80˚C、2 分間

8.　判定

【検査を行う前の準備および注意事項】

サンプルの準備

■　コントロール

　本キットには、検査の成否を確認するための**Phytoplasma陽性コントロール**が添付されています。検査の成否を確認するには、**Phytoplasma陽性コントロール**を添加する「陽性コントロール検査溶液」および未使用の**Phytoplasma抽出液**を添加する「陰性コントロール検査溶液」の作製が重要です。

■　アジサイサンプル準備

　検査にはアジサイ葉から抽出したDNAを使用します。本キットは、アジサイの葉やがくからDNAの簡易抽出を行うための試薬（**Phytoplasma抽出液**）及び簡易抽出プロトコルを備えていますので、検査を行う前にDNAを準備してください。

器具、機器の準備

■　インキュベーター（恒温器）

　インキュベーター（恒温器）の電源を入れ、それぞれ温度を設定します。ウォーターバス、ヒートブロックを使用する場合は温度が安定するまでに時間を要する場合がありますので、あらかじめ電源を入れ、温度計を用いて目的の温度に到達していることを確認してください。エアーインキュベーターを用いる場合、機器によってはドアの開閉時に庫内温度が大きく変化しますので、ドアの開閉は速やかに行ってください。

■　器具

器具	使用方法
マイクロピペット	各区域専用とし、他の区域で使用した場合は核酸除去操作を施してから元の場所に戻してください。
チューブラック	各区域専用とし、他の区域で使用した場合は核酸除去操作を施してから元の場所に戻してください。
チューブ	市販のガンマ線滅菌済チューブ等、核酸フリー、ヌクレアーゼフリーのグレードを選択してください。
フィルター付マイクロチップ（滅菌済）	市販のガンマ線滅菌済疎水性フィルター付チップ等、核酸フリー、ヌクレアーゼフリーのグレードを選択し、各区域にて開封してください。また、連続分注を行うと試薬への汚染が発生する可能性がありますので、1 回ごとに使い捨てとして使用してください。
筆記用具	各区域専用とし、持込書類を置く専用のスペースを確保してください。
手袋	使い捨てとし、汚染が疑われる場合はすぐに手袋を交換してください。
白衣	各区域専用とし、袖口からの汚染に注意してください。

検査環境

LAMP法は高感度なDNA増幅技術であるため、検査環境に**Phytoplasma陽性コントロール**や検査後サンプル等、鋳型となる核酸の汚染が発生すると、以降正確な検査を行うことが困難になります。サンプルの取り扱いにおいては、作業用の着衣および器具への付着に十分注意し、着衣の交換を徹底してください。以後の検査における誤判定を防止するため、使用済みのチップ、チューブ、検査後サンプルは二重にしたビニール袋にまとめて廃棄してください。また、検査後サンプルおよび**Phytoplasma陽性コントロール**の電気泳動法等による操作やオートクレーブ高圧滅菌処理は行わないでください。

■ 作業区域

核酸抽出および核酸増幅を実施していない（核酸による汚染が存在しない）クリーンベンチあるいは作業台を試薬調製作業区域とし、検査溶液は試薬調製作業区域にて作製してください。試薬調製作業区域では**Phytoplasma陽性コントロール**およびLAMP法において鋳型となる核酸を含む溶液、試薬類の取り扱いは行わないでください。

検査溶液へのサンプルおよび**Phytoplasma陽性コントロール**の添加を行うスペースは試薬調製作業区域と区分し、専用の核酸取扱区域を設けてください。

■ 核酸除去操作

器具は常に清潔に保ってください。洗浄が可能である器具は大量の水道水でよくすすぐことにより、付着した核酸を希釈、除去できます。

高濃度の核酸を取り扱った場合など、核酸による汚染が疑われるような場合には、1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用いて検査環境中に存在する核酸の除去操作を行います。次亜塩素酸ナトリウム水溶液は塩素ガスを発生するので、使用の際には換気に十分注意してください。また、金属に対する腐食性があるため、金属に対して使用する際は、迅速に塩素成分を拭き取る等の対応が必要です。高温環境下における劣化が著しいため、1%水溶液調製後の経過日数や保存温度に注意してください。

＜方法＞

i) 使い捨て手袋を装着します。
ii) 有効塩素濃度 10,000 ppm（1%）の次亜塩素酸ナトリウム水溶液を準備します。
iii) 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を含ませたペーパータオルで作業台、器具を丁寧に拭き、余分な塩素成分は 70%エタノールを含ませたペーパータオルで拭き取ります。
iv) 非金属の器具は次亜塩素酸ナトリウム水溶液に 1 時間以上浸し、よくすすいで乾燥します。
v) 作業台、器具は常に清潔に保ち、定期的に次亜塩素酸ナトリウム水溶液による拭き取り清掃を行います。

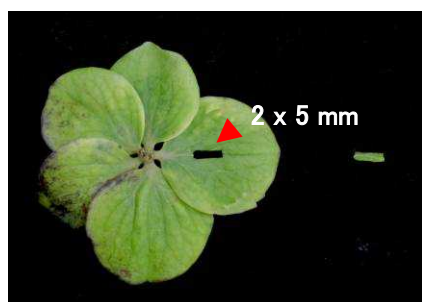
【詳細な使用方法】

DNA の抽出

重要

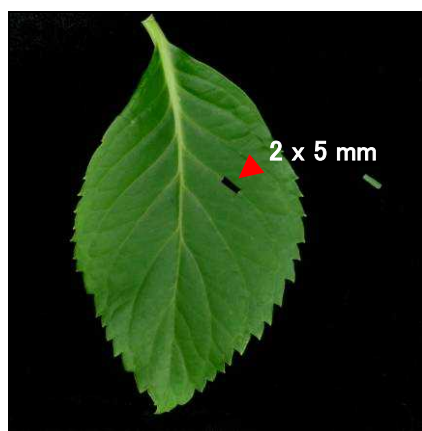
本キットは、アジサイの葉やがくの維管束よりアジサイ葉化病ファイトプラズマDNAの簡易抽出を行うためのPhytoplasma抽出液および抽出プロトコルを備えています。

試薬の融解

Phytoplasma抽出液を取り出し、室温で完全に融解します。容器のキャップを閉じた状態で容器を 10 回上下に反転させて混合し、均一にした後、マイクロチューブに 100.0 µl を分注します。

がくの場合

植物の準備

対象とするアジサイ樹木からがくあるいは葉を採取します。がくおよび葉は清潔なポリエチレン袋等に樹木ごとに分けて採取し、以降の取扱はピンセットを使用してください。ピンセットは使用ごとにアルコールランプあるいはガスバーナーの炎を用いて先端を数秒間加熱するか、エタノールを含ませたペーパータオルで拭き取ってください。

清潔な剃刀を使用してアジサイのがくあるいは葉の葉脈部分を 2 x 5 mm の大きさで切り取ってください（左図参照)。

葉の場合

DNA の抽出

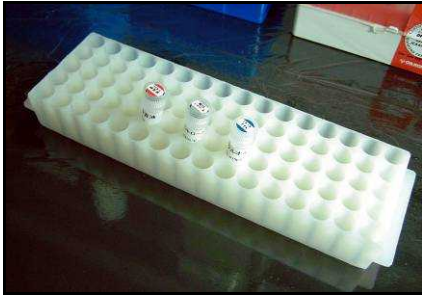
上記のマイクロチューブの**Phytoplasma抽出液**に切り取ったアジサイのがくあるいは葉の葉脈部分が完全に浸るように入れ、マイクロチューブを 95°C で 10 分間保温します。得られた溶液をアジサイ葉化病ファイトプラズマDNA（以下 DNA サンプル）とします。葉脈部分の除去、撹拌は必要ありませんので、そのまま使用してください。

重要

ファイトプラズマは篩部に局在する傾向がありますので、維管束を含む部分を採取してください。

Phytoplasma抽出液に汚染が発生すると、以降正確な検査を行うことが困難になりますので、ご注意ください。未使用の**Phytoplasma抽出液**をマイクロチューブに分注してから保管する場合には、1 テスト分（100.0 µl）ずつを分注した後、−20°C にて遮光して保管してください。

検査反応

試薬の融解

P. asteris**検査液**、P. japonicum**検査液**、Phytoplasma**陽性コントロール**、**ミネラルオイル**を取り出し、室温で完全に融解します。Phytoplasma**酵素液**および**蛍光発色液**は−20°Cでは凍結しないため、使用する直前にキットから取り出します。

混合とスピンダウン

チューブの腹を指で数回軽く叩く（以下タッピング）あるいはボルテックスミキサーにて1秒間 x 3回の攪拌により混合し均一にした後、簡易遠心機を用いて溶液をチューブの底に集め（以下スピンダウン）、試薬を氷上に静置します。

検査溶液の作製

マイクロチューブ（1.5 ml あるいは 2.0 ml）に下記の試薬を必要テスト数分ずつ分注し、タッピングあるいはボルテックスミキサーにて 1 秒間 x 3 回の撹拌により混合した後、スピンダウンを行います。これを検査溶液とし、氷上に静置しておきます。

＜容量＞

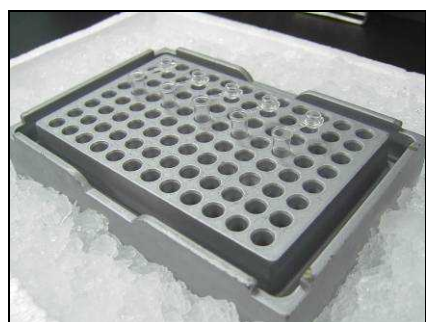
試薬	1テストあたり	8+1 テスト*	24+1 テスト*
P. asteris**検査液** あるいは P. japonicum**検査液**	21.0 µl	189.0 µl	525.0 µl
蛍光発色液	1.0 µl	9.0 µl	25.0 µl
Phytoplasma酵素液	1.0 µl	9.0 µl	25.0 µl
検査溶液合計	23.0 µl	207.0 µl	575.0 µl

＊　分注時の液量の不足を防ぐため、1 テスト分多めに作製する。

重要

連続分注を行うと試薬への汚染が発生する可能性がありますので、フィルター付マイクロチップは 1 回ごとに使い捨てとして使用してください。

Phytoplasma酵素液は粘性が高いため、分注の際、フィルター付マイクロチップの周りに過剰に付着しないようご注意ください。また、使用前にスピンダウンを行ってください。

検査溶液の分注

核酸の汚染がないピンセットを用いて**検査用チューブ**を袋から取り出し、アルミブロックあるいはプレートラックに立て、検査溶液を 23.0 µlずつ分注します。

重要

本キットに添付の**検査用チューブ**と容量、形状、および材質の異なるチューブを使用すると、誤判定の原因となる場合がありますので、使用しないでください。

DNAサンプルの添加

DNAサンプル 2.0 μl を検査溶液に添加後、蒸発による検査溶液の濃縮を防ぐため本キットに添付の**ミネラルオイル**を 20.0 μl 程度重層し、キャップを閉じます（蒸発による検査溶液の濃縮が起こると検査反応の効率が著しく低下しますのでご注意ください)。なお、インキュベーター（恒温器）として、ホットボンネット機能を有するサーマルサイクラーを使用する場合には、ミネラルオイルの添加は不要です。

重要

必要に応じて、陰性コントロールと陽性コントロールを作製してください。

この時の注意事項として、サンプルとミネラルオイルの添加は必ず、①陰性コントロールサンプル、②DNA サンプル、③陽性コントロールサンプル、の順に行ってください。また、サンプル添加後は速やかにキャップを閉じてください。

なお、陰性コントロールサンプルには 2.0 μl の**Phytoplasma抽出液**を使用し、陽性コントロールサンプルには 2.0 μl の**Phytoplasma陽性コントロール**を使用してください。

検査反応

ヒートブロック

全てのキャップを閉じた状態でタッピングあるいはボルテックスミキサーにて 1 秒間 x 3 回の撹拌にて混合した後、スピンダウンを行い、ウォーターバス、ヒートブロック、サーマルサイクラー、エアーインキュベーターなどを用いて 61˚C で 60 分間保温します。

ウォーターバスを使用する場合はフロートプレートを使用し、**検査用チューブ**が反応中に傾かないようにしてください。

フロートプレート

判定

検査の成否の判定

60分間保温した後、80°Cで 2 分間の熱処理により検査反応を停止し、判定を行います。

使用前の**蛍光発色液**は淡い赤色を呈していますが、検査反応の進行により鮮明な黄緑色に変化します。この発色は蛍光に由来しているため、UVを照射することでより正確な判定が可能です。この場合は、別途UV照射装置（240−260 nm あるいは 350−370 nm の波長を出力）および防護用ゴーグルあるいはフェイスシールドが必要になります。波長が320 nm付近の場合、陰性でも蛍光を発して見える場合がありますので、ご注意ください。

最初に、陽性コントロール検査溶液が蛍光を発色し、陰性コントロール検査溶液が蛍光を発色していないことを確認してください。これを満たしていない場合は検査結果を無効とし、原因を究明してください。

重要

本キットでは、検査結果の判定は 60 分間が経過した時点の発色で行います。誤判定の原因となりますので判定は検査反応終了後速やかに行ってください。

サンプルの判定

コントロール検査溶液の判定においてその検査が有効とされた場合、次に、サンプルの判定を行います。判定はコントロール検査溶液と同様に蛍光の発色の有無を確認してください。UV 照射下において蛍光の発色が認められる場合、サンプル中にアジサイ葉化病ファイトプラズマが存在する可能性があります。

＜判定のポイント＞

明確な蛍光の発色が認められるサンプル

「**アジサイ葉化病ファイトプラズマ陽性**」と判定します。ファイトプラズマの識別は、下図の発色パターン I および II を参照してください。

仮に蛍光の発色が微弱であっても、陰性コントロール検査溶液と比較した際に差異が認められる場合には、対象とするアジサイ樹木から別の葉を採取して再度検査を行ってください。

陰性コントロール検査溶液と比較して蛍光の発色に有意な差が認められないサンプル

「**アジサイ葉化病ファイトプラズマ陰性**」と判定します（下図発色パターン III 参照）。

ただし、ファイトプラズマはアジサイ樹木中に不均一に分布している場合があります。病徴の有無をよく観察し、感染が疑われる場合は再度複数箇所の葉を採取して検査を行ってください。

＜発色パターンの例＞

発色パターン	I	II	III	IV
P. asteris 検査液	陽性	陰性	陰性	陽性
P. japonicum 検査液	陰性	陽性	陰性	陽性
判定	*Ca.* P. asteris 感染	*Ca.* P. japonicum 感染	陰性	その他

パターン IV の場合

再度検査をやり直してください。再検査でも同様の結果が得られる場合には、東京大学 植物病院®までご相談ください。

重要
本キットの判定結果に関わらず、アジサイ葉化病ファイトプラズマの感染が疑われる場合には、東京大学 植物病院®までご相談ください。

東京大学 植物病院®；http://papilio.ab.a.u-tokyo.ac.jp/cps/hospital/
住所： 東京都文京区弥生1-1-1
TEL： 03-5841-0567
E-mail： byoin@todaiagri.jp

5. トラブルシューティング

本キットの使用において何らかの問題が発生した場合は、以下の項目に従って対処してください。その他の不明な点については株式会社ニッポンジーンまでお問い合わせください。

問題点	原因および対処法
コントロール検査溶液が正確な発色を示さない	**A. Phytoplasma陽性コントロールの添加量が過剰である。** **Phytoplasma陽性コントロール**の添加量が過剰になると検査反応の効率が低下する場合があります。**Phytoplasma陽性コントロール**の添加量は取扱説明書の指示に従ってください。 **B. 試薬あるいは検査環境に汚染が存在する。** 陰性コントロール検査溶液が発色している場合、鋳型となる核酸の混入が疑われます。試薬および検査環境の汚染モニタリング、1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液による検査器具、機器類の拭き取り操作を行い、汚染を完全に除去した後に検査を実施してください。 **C. キレート化合物あるいは金属イオンが持ち込まれている。** EDTA（エチレンジアミン四酢酸）等のキレート化合物が存在すると検査反応の進行に関わらず蛍光発色液が蛍光を発色します。一方、金属イオンが多量に存在する場合は蛍光発色液の発色が阻害され、判定が困難になりますのでご注意ください。 **D. 反応温度、操作手順に誤りがある。** 検査の工程で問題が発生していないか確認してください。
蛍光発色液が変色した	**A. 検査反応終了後、速やかに判定を行ってください。** 蛍光発色液は長時間放置すると検査反応の進行に関わらず蛍光の発色あるいは消光が起こり、誤判定の原因となります。保存および取り扱いは本取扱説明書の指示に従ってください。
検査溶液が蒸発した	**A. 反応チューブが均一に加熱されていない。** ウォーターバス、ヒートブロックを使用する場合に、検査用チューブが均一に加熱されないと蒸発による検査溶液の濃縮が起こり、検査反応の効率が低下します。本キットに添付の**ミネラルオイル**を必ず添加してください。
蛍光の発色の有無を判断しにくい	**A. 励起波長が合っていない。** 240−260 nm あるいは 350−370 nm の波長を出力する UV 照射装置が必要です。波長が 320 nm 付近の場合、陰性でも蛍光を発する場合がありますので、ご注意ください。
試薬が不足する	**A. チューブ内壁に試薬が飛散、付着している。** 使用前にスピンダウンを行ってください。 **B. 保存中に試薬が蒸発している。** 使用後はキャップを完全に閉じてください。

6. 文献・資料

1. 兼平 勉、堀越 紀夫、山北 祐子、篠原 正行 (1996) アジサイ葉化病（新称）の発生とphytoplasmaの検出 日植病報 **62** (5): 53

2. Lawson RH, Smith FF (1980) Three stable types of Hydrangea virescence that differ in severity in foliage and flowers. *Plant Dis*. **64** (7): 659

3. Namba S, Kato S, Iwanami S, Oyaizu H, Shiozawa H. (1993) Detection and differentiation of plant pathogenic mycoplasmalike organisms using polymerase chain reaction. *Phytopathology*. **83** 786

4. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. **28** (12): e63

5. Prince AM, Andrus L. (1992) PCR: how to kill unwanted DNA. *Biotechniques.* **12** (3): 358

6. Sawayanagi T, Horikoshi N, Kanehira T, Shinohara M, Bertaccini A, Cousin MT, Hiruki C, Namba S. (1999) "*Candidatus* phytoplasma japonicum," a new phytoplasma taxon associated with Hydrangea phyllody. *Int J Syst Bacteriol*. **49** (3): 1275

7. 付録

【品質管理】

キットに添付の**Phytoplasma陽性コントロール** 2.0 µl を鋳型として 25.0 µl (1 テスト分) の容量でDNA増幅反応を行い、61°C、60 分間で**蛍光発色液**が発色することを確認しています。

【Phytoplasma陽性コントロールのコピー数】

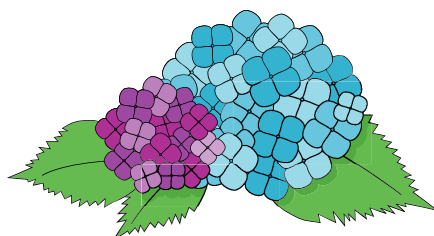
Phytoplasma陽性コントロールには、2.0 µl あたりおよそ 1x 10^6 から 1x 10^8 コピーの標的配列が含まれています。**Phytoplasma陽性コントロール**は、P. asteris**検査液**およびP. japonicum**検査液**に対し共通に使用することが可能です。

8. 関連製品

製品名	包装単位	希望納入価格 （税別）	Code No.
トマト黄化葉巻病診断キット	50 テスト用	33,300 円	NE0011
トマト黄化葉巻病診断キット Ver.2	10 テスト用	33,300 円	NE0021
カンキツグリーニング病診断キット	48 テスト用	42,200 円	NE0031
	192 テスト用	138,800 円	NE0033
マツ材線虫病診断キット	24 テスト用	22,200 円	NE0041
	96 テスト用	86,600 円	NE0043
タバココナジラミバイオタイプ Q 検出キット	12 テスト用	17,200 円	NE0061
プラムポックスウイルス検出キット	48 テスト用	47,900 円	NE0071
	192 テスト用	182,000 円	NE0073
ウリ類退緑黄化ウイルス検出キット	24 テスト用	26,700 円	NE0081
イチジクモザイク病診断キット	48 テスト用	47,900 円	NE0091
診断キットスターターセット	1 セット	13,300 円	NE0051

上記製品は、株式会社富士通システムズ・イーストが運営する、e Genome Order（イーゲノムオーダー）より販売しています。ご購入に関しては、株式会社富士通システムズ・イーストまでお問い合わせください。

株式会社富士通システムズ・イースト

e Genome Order（イーゲノムオーダー）; http://genome.e-mp.jp/

- 記載内容や製品仕様、価格に関しては予告なく変更する場合があります。
- 本取扱説明書の記載内容は 2012 年 6 月現在のものです。最新の取扱説明書は株式会社ニッポンジーンホームページからダウンロードしてください。
- 「ニッポンジーン」および「NIPPON GENE」は、株式会社ニッポンジーンの日本における登録商標です。
- その他、製品名等の固有名詞は各社の商標あるいは登録商標です。
- 記載内容および写真の複製、転載を禁止します。

本キットに関するお問い合わせ先	
株式会社ニッポンジーン	
TEL	076-451-6548
FAX	076-451-6547
E-mail	support@nippongene-analysis.com
URL	http://nippongene-analysis.com

ご購入に関するお問い合わせ先	
株式会社富士通システムズ・イースト	
TEL	03-5977-5573
FAX	03-5977-5574
E-mail	feast-egenome@cs.jp.fujitsu.com
URL	http://genome.e-mp.jp